

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin

Klinikum Westend

Vormaliger Direktor: Prof. Dr. med. V. Becker

Die Inaktivierung von Gastrin II und Pentagastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter Plewe

aus Elbing

1973

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin

Klinikum Westend

Vormaliger Direktor: Prof. Dr. med. V. Becker

Die Inaktivierung von Gastrin II und Pentagastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter Plewe

aus Elbing

Referent: Privatdozent Dr. med. H.P. Seelig

Korreferent: Professor Dr.med. N. Rietbrock

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20.2.1973



Inhaltsverzeichnis

Seite

I. <u>Einleitung</u>	4
II. <u>Material</u>	11
1. Versuchstiere	11
2. Pentagastrin und Gastrin II	11
3. Partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat	12
III. <u>Methodik</u>	14
1. Anlegung einer transduodenalen Magenfistel bei Ratten	14
2. Analyse der Magensäfte	15
3. Inkubationsversuche	16
4. Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe von CBO-Gly-Phe-NH ₂ durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat	17
a) Ammoniakbestimmung	17
b) Versuchsablauf	18
IV. <u>Ergebnisse</u>	21
1. Volumensekretion und HCl-Konzentration an nicht stimulierten Ratten mit akuter transduodenogastrischer Fistel	21
2. Dosiswirkungskurven von Pentagastrin und Gastrin II bei Ratten mit akuter transduodenogastrischer Fistel	22
a) Dosiswirkungskurve von Pentagastrin	22
b) Dosiswirkungskurve von Gastrin II	25
3. Volumensekretion und HCl-Konzentration nach Injektion von partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat	28
4. Inaktivierung von Pentagastrin und Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat	29
a) Inaktivierung von Pentagastrin	29
b) Inaktivierung von Gastrin II	32

	<u>Seite</u>
5. Amidhydrolyse von CBO-Gly-Phe-NH ₂ durch partikelfreie Überstände aus Rattennieren- homogenat	35
V. <u>Diskussion</u>	37
VI. <u>Zusammenfassung</u>	43
Literaturverzeichnis	44
Lebenslauf	

I. Einleitung

Im Jahre 1964 gelang GREGORY und TRACY die Isolierung und Reindarstellung der säurestimulierenden Hormone Gastrin I und Gastrin II aus der Antrumschleimhaut von Schweinemägen. Damit fand die Theorie von EDKINS, der 1905 bereits vermutet hatte, daß die Säureproduktion im Magen hormonal stimuliert werde, eine späte Rechtfertigung.

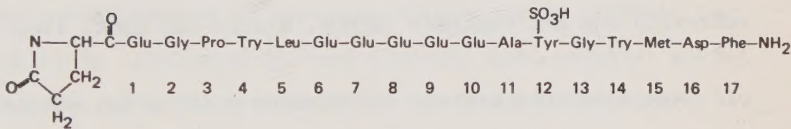


Abb. 1 Strukturformel des menschlichen gastrointestinalen Hormons Gastrin II

Gastrin ist ein Polypeptid mit Amidcharakter, bestehend aus 17 Aminosäuren (Heptadekapeptid). Beim Menschen und bei verschiedenen Säugetierspezies wurden bisher zwei Gastrinarten - Gastrin I und Gastrin II - gefunden. In ihrer physiologischen Wirkung sind sie gleichwertig. Das Molekulargewicht für menschliches Gastrin I beträgt 2096, für Gastrin II 2176. Sie unterscheiden sich dadurch, daß bei

Gastrin I eine Sulfatestergruppe an dem Tyrosinrest fehlt (Abb. 1). Die C-terminale Amidgruppe und der N-terminale Pyroglutamylrest bewahren das Molekül vor dem Abbau durch Carboxypeptidasen bzw. Aminopeptidasen (GREGORY, HARDY, JONES, KENNER und SHEPPARD, 1964).

Zu den biologischen Eigenschaften von Gastrin zählt die Stimulierung der Salzsäureproduktion, die Anregung der Pepsinsekretion des Magens und die Abgabe von Wasser, Elektrolyten und Bikarbonat aus dem Pankreas und der Leber. Daneben bewirkt es eine Tonussteigerung von Magen, Dünndarm und Gallenblase sowie eine Steigerung des Gallenflusses und der Enzymsekretion aus dem Pankreas (NYHUS, MIGNON und SEMB, 1965).

Die physiologische Wirkung des Hormons Gastrin ist allein an das C-terminale Tetrapeptid (Try-Met-Asp-Phe-NH₂) gebunden. Das synthetische Pentagastrin (Gastrodiagnost/MERCK) (N-tert-Butyloxycarbonyl- β -alanyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-alpartyl-L-phenyl-alaninamid, Mol.Gew. 767,9) ist zwar quantitativ schwächer, aber qualitativ genauso wirksam wie das Heptadekapeptid.

Gastrin wird von Zellen im unteren Drittel der Antrum mukosa gebildet (McGUIGAN, 1968). Die Freisetzung aus dem Antrum erfolgt unter physiologischen Bedingungen in der cephalen Phase durch vagale Übermittlung (UVNÄS, 1942; MAUNG PE THEIN und SCHOFIELD, 1959; OLBE, 1963; EMÄS und FYRÖ, 1965;

GROSSMAN, 1966). Nach Nahrungsaufnahme vermitteln in der sogenannten gastrischen Phase humorale und mechanische Faktoren, wie alkalisches Milieu, Abbauprodukte von Proteinen und die Dehnung der Antrumschleimhaut, die weitere Ausschüttung (CLASSEN, 1968; DEMLING, 1969). Fette und Kohlehydrate sind an der Gastrinfreisetzung nicht beteiligt (GANGULI, 1970). Die Säureproduktion wird nicht nur durch stimulatorische Reize beeinflusst, sondern es spielen dabei auch inhibitorische Faktoren eine Rolle. So konnte eine hemmende Wirkung auf die Gastrinfreisetzung durch Ansäuerung des Antrums nachgewiesen werden (MAUNG PE THEIN und SCHOFIELD, 1959).

Aus der nachgewiesenen ulcerogenen Wirkung eines erhöhten Gastrinspiegels (Zollinger-Ellison-Syndrom) kann vermutet werden, daß auch bei einer Hypergastrinämie als Folge eines gestörten Gastrinabbaues oder einer gehemmten renalen Ausscheidung peptische Geschwüre entstehen können. Auf Grund der Beeinflussung der Magensaftsekretion durch die Leber, die sich in einer Hypersekretion nach Ausschluß des portalen Blutstromes von der Leberpassage (LEBEDINSKAJA, 1933) sowie in einer Hypersekretion nach massiven Leberzellschädigungen (STELZNER, 1969) ausdrückt, wurde die Möglichkeit des Gastrinabbaues in der Leber schon frühzeitig untersucht, zumal das im Antrum freigesetzte Gastrin die Leber passieren muß, bevor es am Magenfundus wirkt.

Die ersten Versuche bestätigen diese Annahme nicht. Nach in-

travenöser und intraportaler Gabe von gereinigten Antrum-extrakten konnte kein Unterschied der Gastrinaktivität gefunden werden. (GILLESPIE und GROSSMAN, 1962). Erst nach intraportaler Injektion von synthetischem Gastrin (SHG 2-17) beim Hund konnte eine Aktivitätsminderung festgestellt werden (THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, 1969). Mit reinem natürlichem Gastrin II (Schweinegastrin) wurde nach Leberpassage am Menschen ein 37%iger Wirkungsverlust ermittelt (BEGER, WITTE, MEVES und KRAAS, 1970). Eine nahezu vollständige Inaktivierung von Pentagastrin nach Leberpassage wurde mehrfach nachgewiesen. (LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER, 1967; THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, 1969; BEGER, WITTE, MEVES und KRAAS, 1970). Auch nach Inkubation von Pentagastrin mit partikelfreien Überständen aus Rattenleberhomogenat konnte die Inaktivierung von Pentagastrin biologisch am Rattenmagen beobachtet werden (SEELIG, LINTHE, LÜDKE, PLEWE, MÜLLER, WÜSTLING und KESSLER, 1970).

Vermutet wurde auch, daß die Niere beim Abbau von Gastrin beteiligt sein könnte. Nach intravenöser Gabe von radioaktivem Gastrin konnte eine hohe Inkorporation radioaktiven Materials in der Nierenrinde nachgewiesen werden (JAFJE und NEWTON, 1969 und NEWTON und JAFJE, 1971). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Speicherung von Gastrin und folgende Metabolisierung. Dagegen zeigten Untersuchungsbefunde von Ratten, bei denen in einer Versuchsgruppe die Nieren entfernt worden

waren, während sie der anderen Gruppe belassen blieben, keine signifikante Differenz in der Säuresekretion nach Applikation unterschiedlicher Gastrindosen (TRUEBLOOD, KOHATSU, OBERHELMAN und ALTO, 1969). REEDER und THOMPSON (1971) konnten nachweisen, daß auch bei urämischen und dialysierten Patienten der Serumgastrinspiegel im Normbereich blieb. Außerdem war vor und hinter der Dialyse-Membran, die technisch für die Gastrinpassage kein Hindernis darstellte, keine unterschiedliche Gastrinkonzentration feststellbar.

Inwieweit die renale Ausscheidung im Gastrinstoffwechsel eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Sicher kann ein Molekül von der Größe des Gastrinmoleküls die Glomerula passieren und im Urin erscheinen. Doch konnten mit Hilfe von radioaktiv markiertem Gastrin nur sehr geringe Mengen im Urin nachgewiesen werden (CLENDINNEN, DAVIDSON, JACKSON und THOMPSON, 1970). NEWTON und JAFFE (1971) fanden nach 2 Stunden nur 2% der intravenös applizierten Gastrinmenge im Urin wieder. Zahlreiche Bioassays, die mit dem Urin von Zollinger-Ellison-Patienten gemacht wurden, zeigen, daß eine Ausscheidung größerer Gastrinmengen wahrscheinlich ist. Im Serum solcher Patienten finden sich Gastrinkonzentrationen bis 300000 pg/ml (normal 100 pg/ml), die durch einen Gastrin produzierenden Tumor hervorgerufen werden. 1960 (GREGORY, TRACY, FRENCH und SIRCUS) gelang die Isolierung einer Gastrin ähnlichen Substanz aus einem solchen Tumor, die sowohl in ihren chemischen als auch phy-

siologischen Wirkungen dem antralen Hormon Gastrin entsprach. Mit dem Urin von Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom konnte eine Stimulation der Salzsäuresekretion bei Whistarratten nachgewiesen werden (BONFILS, BADER, DUBRASQUET und LAMBLING, 1963; LAMBLING, BONFILS, BADER und DUBRASQUET, 1965 und BADER, BONFILS, LAUDAT, DUBRASQUET und LAMBLING, 1966). Ebenfalls trat eine Stimulation bei mehreren Personen ein, die an Ulcus duodeni, Magengeschwür, Pankreatitis, Karzinomstenosen des Pylorus und Portocavalen Shunts erkrankt waren. Auch hier scheint ein Übertritt von Substanzen mit Gastrinaktivität in den Urin erfolgt zu sein. Die beim Zollinger-Ellison-Syndrom ausgeschiedene Gastrinmenge muß recht erheblich gewesen sein, da mit dem Urin dieser Patienten in mehreren Fällen eine signifikante Steigerung der HCl-Sekretion bei der Ratte erzielt wurde (BONFILS, VATIER und ACCARY, 1970; MOORE, MURAT, ENDAHL, BAKER und ZOLLINGER, 1967; WILKEN, HARDY, TURNER, LOWE, HUNT und BILLUPS, 1969; WILSON, MATHISON, SCHULTE und ELLISON, 1968). Aus dem Urin konnten zwei Peptide isoliert werden (BONFILS, VATIER und ACCARDY, 1970): die sogenannte V-Fraktion - eine biologisch sehr aktive Substanz, die in ihrer Struktur einige Abweichungen zum Gastrin-Molekül aufweist - und eine G-Fraktion, die die menschlichen Gastrinbestandteile beinhaltet. Die G-Substanz scheint mit der Hypergastrinämie beim Zollinger-Ellison-Syndrom im Zusammenhang zu stehen. Die Niere besitzt anscheinend eine Schwellendosis für Gastrin. Sie wird erst überschritten bei Serumgastrinwerten, wie sie beim Zollinger-Ellison-Syndrom auftreten.

Diese Befunde machen deutlich, daß der renalen Ausscheidung beim Gastrinabbau unter physiologischen Bedingungen keine entscheidene Rolle beizumessen ist, während dem Gastrin-Metabolismus in der Niere eine größere Rolle zukommen dürfte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Niere die Fähigkeit zur Inaktivierung von Gastrin und Pentagastrin besitzt. Hierzu wurde die Aktivität von Gastrin und Pentagastrin nach Inkubation mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat im biologischen Test an der Ratte geprüft.

II. M a t e r i a l

1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Whistarratten mit einem Gewicht von 200 - 550 g verwendet. Zur Vermeidung von Koprophagie wurden die Tiere 48 Stunden vor Versuchsbeginn in Drahtgitterkäfige mit durchlässigem Gitterboden gesetzt. Während dieser Zeit erhielten sie als Nahrung eine Glucose-Kochsalzlösung (150 g Glucose und 8 g NaCl/1000ml) in beliebiger Menge.

2. Pentagastrin und Gastrin II

Pentagastrin kam in Form des im Handel befindlichen Präparates Gastrodiagnost[®] (Fa. Merck) zur Anwendung. Es handelt sich hierbei um das synthetisierte Polypeptid N-tert-Butyl-oxycarbonyl- β -alanyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid (Mol. Gew. 767,9). Chemisch entspricht die Substanz dem Pentagastrin ICI 50, 123.

Gastrin II wurde in Anlehnung an die von GREGORY und TRACY (1964) beschriebene Methode aus dem Antrum frischer Schweinemägen extrahiert. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in der Anlagerung von Gastrin als negativ geladenes Peptid an einen Ionenaustauscher (DEAE-Zellulose). Nach verschiedenen Extraktionsstufen erfolgte dann die chromatographische Auftrennung in Gastrin I und II. Anschließend wurde Gastrin II noch

einmal auf AE-Zellulose mit linearem Ammoniumbicarbonat - Gradienten chromatographiert. Das überschüssige Ammoniumbicarbonat wurde durch mehrfache Lyophilisation entfernt. Das Material erwies sich hochspannungselektrophoretisch als rein (genaue Angaben über die Methodik siehe SEELIG 1971).

3. Partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Ratten wurden in Äthernarkose die Nieren entfernt. Anschließend wurden diese sofort vom anhängenden Fettgewebe befreit und in eisgekühlten Tris-HCl-Puffer (0,2 M; pH 7,4) gegeben. Dem Puffer war zur Vermeidung bakteriellen Wachstums 0,02 % Natriumazid zugesetzt worden. Der Aufschluß der Zellen im Gewebe wurde mit einem Sorvall-Omni-Mixer im Eisbad in wechselnder Folge von je 1 Min. Homogenisieren und 1 Min. Kühlen unter Zusatz von zwei Gewichtsteilen Puffer durchgeführt. Die Dauer des Homogenisierens betrug 10 Min. bei 1400⁰ RPM. Danach wurde das Homogenat zur Entfernung gröberer Bestandteile kühlzentrifugiert (20 Min. bei 2000 g) und unmittelbar darauf ultrazentrifugiert (60 Min. bei 104000 g; 2⁰ C). Zum Schluß wurde der partikelfreie Überstand aus Rattennierenhomogenat in sterile Ampullen abgefüllt, die bis zur Verwendung in einer Kühltruhe (-18⁰ C) gelagert wurden. Der Proteingehalt betrug nach dem Kjeldahlverfahren 3,8 g%.

Zur Ammoniakbestimmung (siehe Punkt III./4a) konnte dieses Ultrazentrifugat wegen des hohen Gehaltes an Ammoniak freisetzenden Bestandteilen nicht verwendet werden. Es wurde daher

24 Stunden gegen 0,2 M Tris-Puffer pH 7,4 dialysiert (Visking Dialysierschlauch) und anschließend lyophilisiert. Die Aufbewahrung erfolgte dann ebenfalls bei -18°C .

III. M e t h o d i k

1. Anlegung einer akuten transduodenalen Magenfistel bei Ratten

Die Operation wurde nach der von BONFILS, ROSSI und LAMBLING (1958) angegebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit "Äther pro narcosi" betäubt, gewogen und an Vorder- und Hinterbeinen mittels kleiner Riemen auf einem Plexiglasbrett fixiert. Das Abdomen wurde durch einen 2 cm langen Median-schnitt eröffnet, das Duodenum freigelegt und 5 cm unterhalb des Pylorus inzidiert. Durch die Inzision wurde ein PVC-Katheter (ca. 10 cm lang, Durchmesser innen 2 mm, außen 3 mm; an der Spitze mehrfach perforiert) etwa 1 cm tief in den Magen eingeführt. Nach Unterbindung des Pylorus mit einem Catgutfaden (Nr.3-0) wurde der Bauchschnitt zweischichtig vernäht und der Katheter am unteren Ende des Schnittes nach außen geführt. Die Plexiglasunterlage und das mit seinem Rücken daraufliegende Tier wurden anschließend mit Mullbinden umwickelt und umgekehrt auf ein Gestell gelegt (Abb.2). Das Tier lag nun mit seinem Bauch dem Mullbindenverband auf, war am Körper abgestützt, für die Dauer des Versuches sicher fixiert und behielt so doch ein gewisses Maß an Beweglichkeit.



Abb. 2 Postoperative Fixation der Ratte während des Versuches

2. Analyse der Magensäfte

Der Magensaft wurde über zweimal 180 Minuten

Probe a = 0 - 180 Min.

Probe b = 181 - 360 Min.

in graduierten Zentrifugengläsern gesammelt. Die erste Portion (Probe a) enthielt das Nüchternsekret des unbeeinflussten Tieres. Zu Beginn der zweiten Sammelperiode wurde den Tieren das zu untersuchende Material subcutan in die Schenkelbeuge injiziert.

Die Titration der Magensäfte erfolgte mit 0,15 n Natronlauge, wobei zur Bestimmung der totalen HCl-Konzentration auf pH 7,0 titriert wurde. Als Meßeinrichtung dafür standen zur Verfügung eine Glaselektrode und ein pH-Meter. Die Natronlauge

wurde mit einer geeichten Präzidenzspritze (KÜHN) zugegeben, deren Stempel mit einer Mikrometerschraube (BRAUN) bewegt wurde. Vor der Titration war diese Anordnung mit einem Sammel-magensaftgemisch geeicht worden. Die maximale Fehlerbreite betrug 2,8 %.

Wegen der großen individuellen Streuung der Volumensekretion und der HCl-Konzentration innerhalb der ersten Sammelperiode wurden nur Tiere mit einer Volumensekretion zwischen 1,5 und 6,0 ml/180 Min. und einer HCl-Konzentration zwischen 25,0 und 70,0 mval/l ausgewertet. Verunreinigte und blutige Säfte wurden von vornherein nicht verwandt.

Die statistische Auswertung aller Meßdaten erfolgte mit einem programmierbaren Tischcomputer (WANG). Festgestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Volumen, HCl-Konzentration und Sekretion bei pH 7,0 in Probe a und b. Die Signifikanzen wurden nach dem t-Test (Student) ermittelt.

3. Inkubationsversuche

Es wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt (vergl. Tab.1):

- A. Kontrolle: Vergleich der Nüchternsekretion beider Sammelperioden a und b an nicht stimulierten Tieren.
- B. Kontrolle: Vergleich der Nüchternsekretion beider Sammelperioden a und b nach Injektion von 1,5 ml partikelfreien Überstandes aus Rattennierenhomogenat (aufgefüllt mit 0,5 ml Saline auf 2,0 ml).

- C. Stimulierung der Sekretion mit 20 - 620 μ g Pentagastrin kg KG (gelöst in je 1 ml Saline).
- D. Stimulierung der Sekretion mit 5 - 160 μ g Gastrin II kg KG (gelöst in je 1 ml Saline).
- E. Inaktivierung von Pentagastrin (80 μ g/kg KG) durch partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat (0,5 ml Pentagastrin und 1,5 ml Homogenat).
- F. Inaktivierung von Gastrin II (40 μ g/kg KG) durch partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat (0,5 ml Gastrin II und 1,5 ml Homogenat).

Tab.1

Anzahl der ausgewerteten Ratten je Versuchsgruppe

Versuchsreihe	A	B	C	D	E	F
Anzahl d.Tiere(n)	35	4	60	58	20	34

4. Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe von CBO-Gly-Phe-NH₂ durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

a) Ammoniakbestimmung

Der durch Amidasewirkung an dem C-terminalen Amid von CBO-Gly-Phe-NH₂ (Carbobenzoxylglycylphenylalaninamid) durch partikelfreien Überstand freigesetzte Ammoniak wurde nach der von SCHMIDT und SCHWARZ (1966) entwickelten und nach

SEELIG (1971) modifizierten Ammoniakbestimmung gemessen (vergl. Tab. 2). Die Reaktion ist für Ammoniak spezifisch. Sie beruht auf dem umgekehrten Glutamatdehydrogenasenachweis.

An Reagenzien wurden verwendet:

1). 0,2 M Trispuffer, pH 7,8; 2). 0,08 M α -Ketoglutarat;
3). NADH-Lösung (20 mg NADH mit 1% NaHCO_3 in einem Volumen von 1,0 ml lösen); 4). 0,2 M $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; 5). Testgemisch, bestehend aus 46,0 ml Trispuffer, 3,0 ml α -Ketoglutarat und 1,0 ml NADH;
6.) 10% Trichloressigsäure; 7). NH_3 -Standardlösung: 53,5 mg NH_4Cl lösen, 2,5 ml in HCl zugeben und mit Aqua tridest auf 250 ml auffüllen. Die NH_3 -Konzentration beträgt 0,4 $\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}$. Als Standard wurde eine 1:10 verdünnte Lösung verwendet.

b) Versuchsablauf

Für die Bestimmung der Hydrolyse des C-terminalen Amids von CBO-Gly-Phe- NH_2 wurde pro Inkubationsansatz 0,1 μMol CBO-Gly-Phe- $\text{NH}_2/100 \mu\text{l}$ 0,2 M Trispuffer pH 8,2 mit 100 μl dialysiertem partikelfreiem Überstand aus Rattennierenhomogenat inkubiert (Proteingehalt nach dem Kjeldahlverfahren 3,8 g%). Die Inkubationszeiten betrugen 10, 20, 30 und 60 Min. bei 37°C. Für jede Untersuchung wurden 4 Ansätze mit 8 NH_3 -Bestimmungen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde unter gleichen Versuchsbedingungen sowohl der Ammoniakgehalt im partikelfreien Überstand ohne Substratzusatz (K_1) als auch der Ammoniakgehalt der Substratlösung (K_2) ermittelt. Durch Vergleich von Probe und Leerwert mit einer Standardlösung (0,4 μMol $\text{NH}_4\text{Cl}/100 \mu\text{l}$) läßt sich die

freigesetzte Ammoniakmenge berechnen. Die Formel dafür lautet:

$$\frac{0,04 \cdot (\Delta E_P - \Delta E_L) - (\Delta E_{K1} - \Delta E_L) - (\Delta E_{K2} - \Delta E_L)}{(\Delta E_{St} - \Delta E_L)} = \mu\text{Mol NH}_3$$

$\Delta E = E_I - E_{II}$; P = Leerwert; St = Standard

Tab.2

Reaktionsansatz für quantitative Ammoniakbestimmung
(Volumina in μl)

1. Amidasereaktion:

	Leerwert	Standard	Probe	Kontrolle ₁	Kontrolle ₂
0,4 μMol $\text{NH}_4\text{Cl}/100 \mu\text{l}$	---	100	---	---	---
Aqua tridest	200	100	---	100	100
Substrat (CBO- Gly-Phe-NH ₂)	---	---	100	---	100
Enzym (Nie- renhomogenat)	---	---	100	100	---
Inkubation bei 37° C					
Trichloressig- säure (TCE)	200	200	200	200	200

Zentrifugieren, Eisbad!

B. Ammoniakreaktion:

Doppelter NH_3 -Ansatz aus Leerwert, Standard, Probe, Kontrolle₁
und Kontrolle₂

Überstand (TCE gefälltes Mate- rial aus A.)	100	100
K_3PO_4 (0,2 M)	100	100
Testgemisch	150	150
150 μl entnehmen, E_T messen, verwerfen 340 nm, MT4- Küvetten, 1 cm Schicht- länge, Zeiss-Spektralphotometer PMQ II		
GLDH (zu den Restvolumina)	6	6

Inkubation 40 Min. 25°C ,
danach E_{II} messen wie oben

IV. E r g e b n i s s e

1. Volumensekretion und HCl-Konzentration an nicht stimulierten Ratten mit akuter transduodenogastrischer Fistel

Bei 35 Versuchstieren lag die mittlere Volumensekretion während der ersten Sammelperiode (= Probe a) bei $3,2 \pm 1,4$ ml. In Probe b sank die Nüchternsekretion auf durchschnittlich $2,6 \pm 1,5$ ml ab. Die HCl-Konzentration sank im Mittel gegenüber der Probe a um $-2,2$ mval/l (Tab. 3). Eine nahezu konstante mittlere Sekretion über die 6-stündige Versuchsdauer kann daher angenommen werden.

Tab. 3

Volumensekretion und HCl-Konzentration am unbeeinflussten Tier

	Volumensekretion (ml)	HCl-Konzentration (mval/l)
Probe a	$3,2 \pm 1,4$	$67,1 \pm 13,5$
Probe b	$2,6 \pm 1,5$	$64,9 \pm 18,9$
Differenz	$-0,6 \pm 1,1$	$-2,2 \pm 16,0$

2. Dosiswirkungskurven von Pentagastrin und Gastrin II bei Ratten mit akuter transduodenogastrischer Fistel

a) Dosiswirkungskurve von Pentagastrin

Nach subcutaner Injektion von 20 bis 620 μg Pentagastrin/kg KG zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der HCl-Konzentration gegenüber der über 180 Min. gemessenen Basalkonzentration (vergl. Tab. 3). Die Zunahme der HCl-Konzentration wird ab einer Pentagastrindosis von 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG signifikant ($p < 0,001$).

Bei 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG findet sich gegenüber der Dosis von 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG mit einer mittleren Konzentrationssteigerung von + 20,7 mval/l ein Rückgang um -1,5 mval/l. Bei weiterer Steigerung der Pentagastrindosen nimmt die HCl-Konzentration weiter zu. Da mit 80 μg in jedem Falle eine signifikante Zunahme der HCl-Konzentration nachweisbar war, wurde diese Menge für die Inaktivierungsversuche eingesetzt.

Es trat besonders bei 620 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG eine starke Zunahme der Volumensekretion auf (Tab. 4). Die Volumensekretion bei niedrigen Pentagastrin-Dosen zeigte eine große Streubreite (zwischen + 0,5 und - 0,2), so daß sie für die Darstellung der Dosiswirkungsbeziehungen nicht verwendet werden konnte.

Tab. 4

Versuchswerte nach s.c. Injektion von 20 bis 620 $\mu\text{g/kg}$ KG
Pentagastrin (gelöst in je 1 ml Saline)

Dosis ($\mu\text{g/kg}$ KG)	Anzahl d. Tiere (n)	Volumen in Probe a (ml)	Vol.-Differenz ggü. Probe a	HCl.-Konz. in Pr. a (mval/l)	Zunahme d. HCl.- Konz. ggü. Pr. a
20	7	$3,1 \pm 1,4$	$+0,5 \pm 1,5$	$67,8 \pm 8,3$	$+ 3,1 \pm 22,0$
40	10	$3,1 \pm 1,5$	$-0,2 \pm 0,9$	$62,2 \pm 9,7$	$+ 13,1 \pm 13,4$
80	9	$3,1 \pm 1,2$	$+0,5 \pm 0,4$	$63,6 \pm 12,8$	$+ 22,2 \pm 14,0$
160	19	$3,1 \pm 1,4$	$-0,1 \pm 1,3$	$68,2 \pm 13,2$	$+ 20,7 \pm 13,7$
320	9	$3,2 \pm 1,4$	$+0,2 \pm 0,5$	$66,8 \pm 11,6$	$+ 22,4 \pm 13,5$
620	6	$2,3 \pm 1,6$	$+1,1 \pm 1,4$	$64,1 \pm 15,5$	$+ 26,2 \pm 16,4$

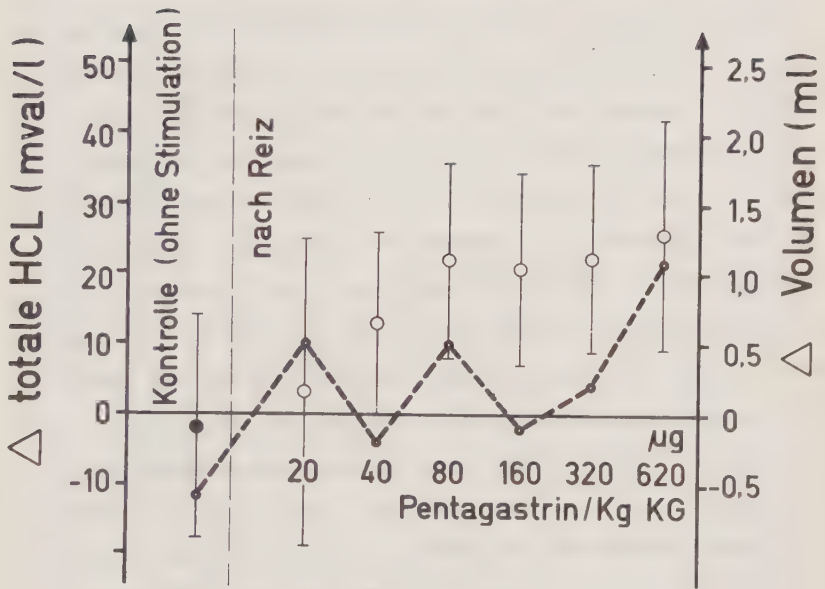


Abb. 3 Dosis-Wirkungskurve von Pentagastrin bei Ratten mit transduodenogastrischer Fistel. Angegeben sind Mittelwerte, Die vertikalen Linien entsprechen der Standardabweichung. (Ordinate: Zunahme der HCl-Konzentration gegenüber Probe a = ———, Volumendifferenz gegenüber Probe a = - - - - -)

b) Dosiswirkungskurve von Gastrin II

Nach subcutaner Injektion von 5 bis 160 μg Gastrin II/kg KG ergab sich eine dosisabhängige Steigerung der HCl-Konzentration gegenüber der 180 Min. lang gemessenen Basalkonzentration (vergl. Tab.3). Außerdem zeigte sich bei Dosiserhöhung eine deutliche Zunahme der Volumensekretion. Augenfällig war, daß bei Gastrinreiz die Wirkung sich schneller bemerkbar machte als bei Pentastrinreiz und sowohl höhere Säurewerte als auch eine höhere Volumensekretion erreicht wurden. So zeigten schon die Werte bei einer Dosis von 5 μg Gastrin II/kg KG eine höhere Säuresteigerung (+ 31,0 mval/l), als sie mit Pentastrin erreicht werden konnte. Ein Maximum der HCl-Konzentration ergab sich bei 80 μg Gastrin II/kg KG mit + 48,4 mval/l (Tab.5). Bei darüber hinausgehender Dosissteigerung trat ein Rückgang ein (+ 41,2 mval/l). Anhand der Dosiswirkungskurve für Gastrin II (Abb.4) wurde 40 μg Gastrin II/kg KG als Ausgangswert für die Inaktivierungs-Untersuchungen verwendet.

Tab. 5

Versuchswerte nach s.c. Injektion von 5 bis 160 $\mu\text{g/kg}$ KG
Gastrin II (gelöst in je 1 ml Saline)

Dosis ($\mu\text{g/kg}$ KG)	Anzahl d. Tiere(n)	Volumen in Probe a (ml)	Vol.-Differenz ggü. Probe a	HCl-Konz. i. Pr.a (mval/l)	Zunahme d. HCl- Konz. ggü. Pr.a
5	14	$2,4 \pm 1,3$	$+ 0,2 \pm 0,8$	$58,8 \pm 10,5$	$+ 31,0 \pm 11,0$
20	11	$2,5 \pm 1,4$	$+ 0,6 \pm 1,4$	$62,4 \pm 11,7$	$+ 34,5 \pm 10,6$
40	6	$3,4 \pm 1,4$	$+ 1,8 \pm 1,5$	$67,4 \pm 13,3$	$+ 40,9 \pm 14,1$
80	10	$2,6 \pm 1,5$	$+ 2,5 \pm 1,7$	$61,3 \pm 10,5$	$+ 48,4 \pm 11,6$
160	17	$2,7 \pm 1,4$	$+ 1,6 \pm 1,3$	$61,2 \pm 11,6$	$+ 41,2 \pm 17,6$

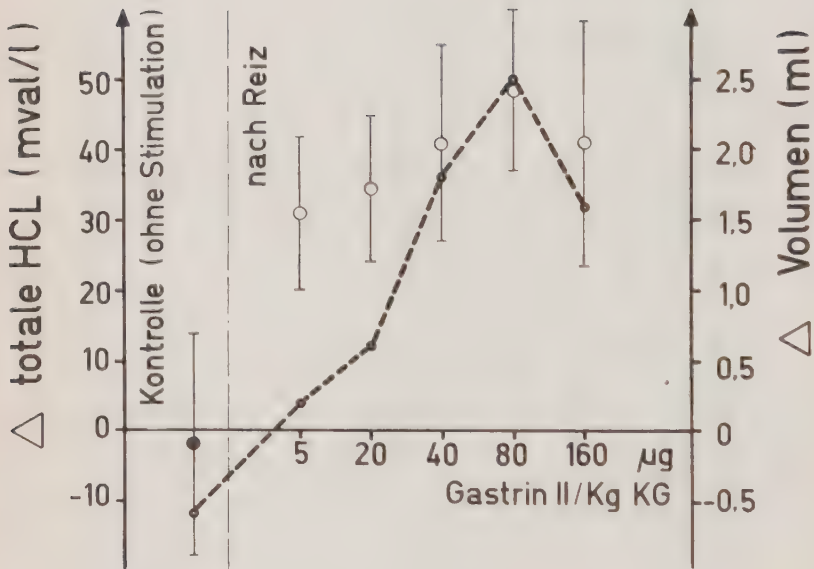


Abb. 4 Dosis-Wirkungskurve von Gastrin II bei Ratten mit transdoudenogastrischer Fistel. Angegeben sind Mittelwerte. Die vertikalen Linien entsprechen der Standardabweichung. (Ordinate: Zunahme der HCl-Konzentration gegenüber Probe a = ———, Volumendifferenz gegenüber Probe a = ———)

3. Volumensekretion u. HCl-Konzentration nach Injektion
von partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat

Zur Kontrolle wurde 4 Tieren am Anfang der Sammelperiode b partikelfreier Überstand aus Rattennierenhomogenat allein in die Schenkelbeuge injiziert. Es zeigte sich sowohl ein leichter Rückgang der HCl-Konzentration (- 9,6 mval/l) als auch eine Abnahme der Volumensekretion (- 1,0 ml) Tab. 6).

Tab. 6

Versuchswerte nach s.c. Injektion von 1,5 ml partikelfreien
Überständen aus Rattennierenhomogenat (aufgefüllt mit
0,5 ml Saline auf 2,0 ml).

	Volumensekretion (ml)	HCl-Konzentration (mval/l)
Probe a	4,0 $\pm$ 1,4	57,0 $\pm$ 3,5
Probe b	3,0 $\pm$ 1,4	47,4 $\pm$ 16,5
Differenz	-1,0 $\pm$ 1,2	- 9,6 $\pm$ 14,7

Der Unterschied in den Sekretionen war gegenüber nicht stimulierten Tieren nicht signifikant ($p = 0,2$). Er konnte daher bei den weiteren Bewertungen vernachlässigt werden.

4. Inaktivierung von Pentagastrin und Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

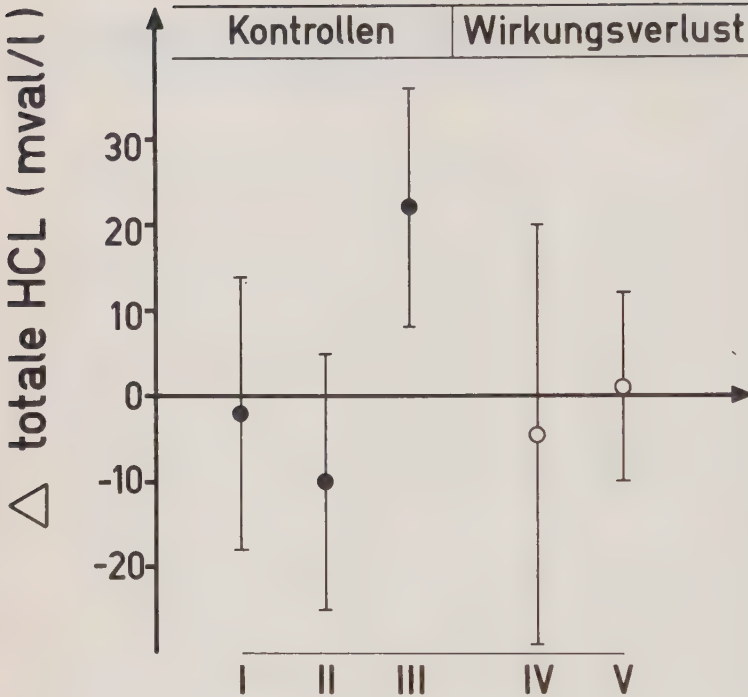
a) Inaktivierung von Pentagastrin

Nach Injektion von 80 µg Pentagastrin /kg KG stieg die HCl-Konzentration in Probe b um durchschnittlich + 22,2 ± 14,0 mval/l an. Dieselbe Pentagastrindosis, mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat gemischt und bei 37°C 30 bzw. 90 Min. inkubiert, erfuhr einen vollständigen Wirkungsverlust, so daß die Werte der Kontrollgruppen beinahe wieder erreicht wurden (Tab.7, Abb.5). Zwischen dem 30-Minuten- und dem 90-Minuten-Wert bestand kein signifikanter Unterschied. Es wurde also bei beiden Inkubationsgemischen die stimulierende Wirkung von Pentagastrin aufgehoben. Auch die Volumina zeigten eindeutig einen Rückgang in Richtung auf die Kontrollwerte.

Tab. 7

Versuchswerte zum Nachweis der Inaktivierung von Pentagastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Versuchs- gruppe	Anzahl d. Tiere (n)	Volumen in Probe a (ml)	Vol.-Differenz ggü. Probe a	HCl-Konz. in Pr. a (mval/l)	HCl-Konz.-Diffe- renz ggü. Pr. a
I Kontrolle (ohne Stimu- lation)	35	3,2 ± 1,4	-0,6 ± 1,1	67,1 ± 13,5	-2,2 ± 16,0
II Kontrolle (Nierenhomoge- nat allein)	4	4,0 ± 1,4	-1,0 ± 1,2	57,0 ± 3,5	-9,6 ± 14,7
III 80 µg Penta- gastrin/kg KG	9	3,1 ± 1,2	+0,5 ± 0,4	63,6 ± 12,8	+22,2 ± 14,0
IV Pentagastrin m.Nierenhomo- genat 30 Min. inkubiert	7	2,7 ± 1,6	-0,5 ± 1,5	56,5 ± 10,1	-4,7 ± 24,5
V Pentagastrin m.Nierenhomo- genat 90 Min. inkubiert	13	4,0 ± 1,2	+0,1 ± 0,8	58,7 ± 10,4	+1,0 ± 10,7



I ohne Stimulation
 II 1,5 ml Homogenat
 III 80 µg Pentagastrin x)

IV 80 µg Pentagastrin mit
 1,5 ml Homogenat 30 Min. inkub.
 V 80 µg Pentagastrin mit
 1,5 ml Homogenat 90 Min. inkub.

Abb.5 Pentagastrinwirkung nach Inkubation mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat. Angegeben sind Mittelwerte. Die vertikalen Linien entsprechen der Standardabweichung. (Ordinate: HCL-Konzentrationsdifferenz gegenüber Probe a)

x) Alle Pentagastrindosen beziehen sich auf kg Körpergewicht (kg KG)

b) Inaktivierung von Gastrin II

Nach subcutaner Injektion von 40 µg Gastrin II/kg KG stieg die HCl-Konzentration um durchschnittlich $+ 40,9 \pm 14,1$ mval/l. Dieselbe Gastrindosis wurde mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat gemischt und bei 37°C 90 bzw. 180 Min. inkubiert. Es trat danach ein vollständiger Wirkungsverlust der HCl-Konzentration und Volumensekretion auf. Die festgestellten Werte hatten fast wieder die Kontrollwerte erreicht. Dagegen zeigte sich bei Hitzeinaktivierung der partikelfreien Überstände aus Rattennierenhomogenat (60 bzw. 120 Min. bei 60°C) und Inkubation des Gemisches (180 Min.) fast wieder die volle Gastrinwirkung (Tab.8, Abb. 6). Besonders deutlich war dieses bei 120 Min. Hitzeinaktivierung. Eine geringere Stimulation ergab der 60 Min.-Wert.

Tab. 8

Versuchswerte zum Nachweis der Inaktivierung von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Versuchsgruppe	Anzahl d. Tiere(n)	Volumen in Probe a (ml)	Vol.-Differenz ggü. Probe a	HCl-Konz. in Pr. a (mval/l)	HCl-Konz.-Differenz ggü. Pr. a
I Kontrolle (ohne Stimulation)	35	3,2 ± 1,4	-0,6 ± 1,1	67,1 ± 13,5	-2,2 ± 16,0
II Kontrolle (Nierenhomogenat allein)	4	4,0 ± 1,2	-1,0 ± 1,2	57,0 ± 3,5	-9,6 ± 14,7
III Gastrin II 40 µg/kg KG	6	3,4 ± 1,4	+1,8 ± 1,5	67,4 ± 13,3	+40,9 ± 14,1
IV Gastrin II m.Nierenhomogenat 90 Min. inkubiert	9	2,9 ± 1,4	+0,2 ± 1,1	58,6 ± 8,6	-3,2 ± 13,9
V Gastrin II m. Nierenhomogenat 180 Min. inkubiert	11	2,7 ± 1,3	-0,4 ± 0,6	65,8 ± 10,3	+1,6 ± 21,5
VI Gastrin II m.hitzeinaktiviertem Nierenhomogenat (60 Min.) 180 Min. inkubiert	4	2,7 ± 1,5	-0,4 ± 2,2	60,0 ± 13,9	+15,4 ± 5,5
VII Gastrin II m.hitzeinaktiviertem Nierenhomogenat (120 Min.) 180 Min. inkubiert	10	2,5 ± 1,3	+0,4 ± 0,6	62,7 ± 7,8	+30,4 ± 15,8

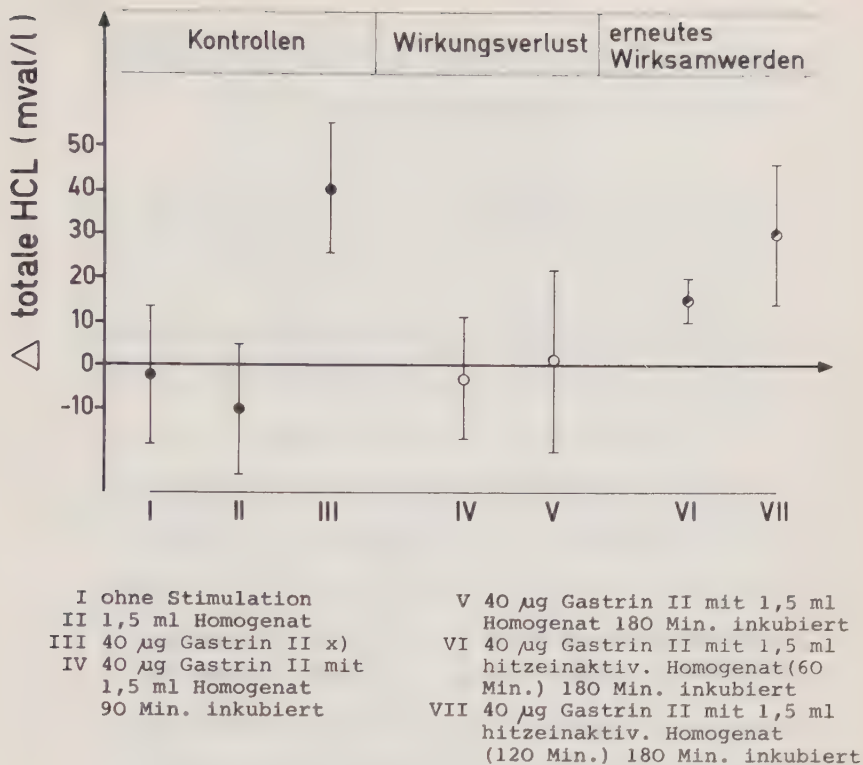


Abb.6 Gastrinwirkung nach Inkubation mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat. Angegeben sind Mittelwerte. Die vertikalen Linien entsprechen der Standardabweichung.

(Ordinate: HCl-Konzentrationsdifferenz gegenüber Probe a)

x) Alle Gastrindosen beziehen sich auf kg Körpergewicht (kg KG)

5. Amidhydrolyse von CBO-Gly-Phe-NH₂ durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

Die biologischen Untersuchungen zeigten eindeutig, daß nach Inkubation von Gastrin und Pentagastrin mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat die Aktivität verloren geht. Als möglicher Inaktivierungsmechanismus könnte eine Desaminisierung in Frage kommen, wie sie für Pentagastrin . von LASTER und WALSH (1968) gefordert wurde.

Aus diesem Grunde wurde die Möglichkeit der Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe von CBO-Gly-Phe-NH₂ (Carbobenz-oxyglycylphenylalaninamid) durch partikelfreien Überstand aus Nierenhomogenat untersucht. CBO-Gly-Phe-NH₂ gleicht in seiner C-terminalen Struktur dem Gastrinmolekül. Da partikelfreie Überstände eine große Menge an ammoniakhaltigen Verbindungen besitzen, die eine Bestimmung der zusätzlichen Hydrolyse an dem Substrat nicht erlaubte, wurde der Überstand 24 Stunden gegen 0,2 M Trispuffer, pH 7,4 dialysiert. Er enthielt danach nur noch Spuren von Ammoniak. In den Untersuchungen wurde die Zeitabhängigkeit der Amidhydrolyse bei dem von SEELIG, MÜLLER und LINTHE (1970) ermittelten pH-Optimum der Leberamidase von 8,2 ermittelt (Tab.9).

Tab. 9

Amidhydrolyse in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubations- zeit (Min.)	$\mu\text{Mol NH}_3$
10	0,002875
20	0,00499
30	0,0074
60	0,0130

Enzym: Rattennierenhomogenat 5 mg/100 μl
Substrat: CBO-Gly-Phe-NH₂ 0,1 $\mu\text{Mol}/100 \mu\text{l}$
Puffer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,2

Nach 60 Min. Inkubationszeit bei 37° C waren 13% des eingesetzten Substrats hydrolytisch gespalten. (Tab.9, Abb.7)

Eine völlige Umsetzung konnte nicht erreicht werden.

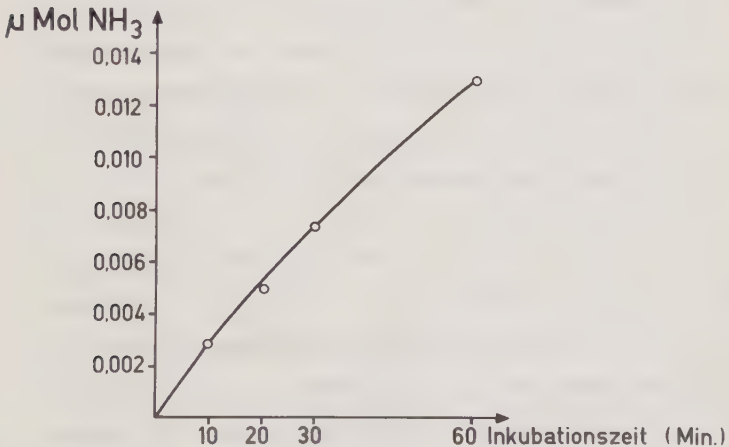


Abb.7 Amidhydrolyse von CBO-Gly-Phe-NH₂ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37° C (Ansatz Tab. 9)

V. D i s k u s s i o n

Aus den hier dargestellten Experimenten geht hervor, daß Gastrin II und Pentagastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat inaktiviert wird. Dieser Effekt konnte durch Hitzeinaktivierung (60°C) des partikelfreien Überstandes zum größten Teil wieder aufgehoben werden. Nach 180 Min. Inkubation (37°C) wurde Gastrin II zu 96 % inaktiviert. Bei Pentagastrin wurde eine Inaktivierung von 95,5 % (90 Min. inkubiert) erreicht. Da nach Hitzeinaktivierung des Überstandes dieser Effekt nicht mehr eintritt, ist möglicherweise enzymatische Hydrolyse der Moleküle für den Aktivitätsverlust verantwortlich. Eine schwache Amidasewirkung des partikelfreien Überstandes der Niere konnte nachgewiesen werden. Hierbei waren die Untersuchungsbedingungen allerdings nicht optimal, da die langdauernde Dialyse zu einer partiellen Inaktivierung der Enzyme führte.

Nach Untersuchungen von BLAIR, FARRA, RICHARDSON und STEINBOK (1970) besitzt Gastrin und Pentagastrin eine kurze Halbwertszeit. So ergab sich für Pentagastrin im strömenden Blut eine Halbwertszeit von 1,50 Min. und für synthetisches Humangastrin I von 2,65 Min. Als Gründe dafür kommen in Frage Verdünnung, Diffusion und Elimination aus dem Blut. Schon in der Spanne von 1,5 und 13 Min. nach schneller

intravenöser Gabe von Pentagastrin und in der Spanne von 1,5 und 15 Min. nach Injektion von synthetischem Gastrin I wurde an der narkotisierten Katze eine schnelle Abnahme der Pentagastrin- bzw. Gastrin-Konzentration im arteriellen Blut festgestellt. Untersuchungen in vitro zeigten gegenüber in vivo-Versuchen bei gleicher Inkubationszeit und Konzentration im Plasma der Katze bei 37°C keinen Aktivitätsverlust. Dies trifft sowohl für synthetisches Humangastrin als auch für Pentagastrin zu. Beim Vergleich unterschiedlicher Konzentration von Pentagastrin und Gastrin wurde eine exponentielle Konzentrationsabnahme über die Zeit festgestellt.

Die Inaktivierung von Gastrin durch Gewebsbestandteile stellt im Stoffwechsel der Peptidhormone keine Besonderheit dar. So beschrieben schon 1942 GREENGARD, STEIN und IVY die biochemische Inaktivierung von Sekretin und Cholezystokinin durch Serum. Ähnliches ist auch von anderen Hormonen bekannt. Jedoch lassen diese Ergebnisse keinen verallgemeinernden Rückschluß hinsichtlich der biochemischen Prozesse im Organismus zu.

In der bisherigen Literatur über Abbau und Inaktivierung von Gastrin bzw. seiner aktiven Komponente (Tetragastrin, Pentagastrin) wurde als möglicher Ort dafür die Leber angenommen. Untersuchungen von GILLESPIE und GROSSMAN (1962) und LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER (1967)

konnten dies nicht bestätigen. Erst 1969 gelang es THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, nach intraportaler Injektion von synthetischem Gastrin (SHG 2-17) beim Hund eine Aktivitätsminderung nachzuweisen. Untersuchungen mit Hilfe von partikelfreien Überständen aus Rattenleberhomogenat erbrachten am Rattenmagen nach 3-stündiger Inkubation (37°C) einen 73%igen Wirkungsverlust von Pentagastrin (SEELIG, LINTHE, LÜDCKE, PLEWE, MÜLLER, WÜSTLING und KESSLER 1970).

Über einen möglichen Abbau in der Niere liegen ebenfalls widersprechende Ergebnisse vor. Eine Beteiligung der Niere bestätigen JAFFE und NEWTON (1969) und NEWTON und JAFFE (1971). Sie fanden nach intravenöser Gabe von radioaktivem Gastrin (^{125}J -Gastrin) eine hohe Inkorporation radioaktiven Materials in der Nierenrinde. Ob es sich dabei allerdings um biologisch aktives Gastrin handelt, ist fraglich.

Wahrscheinlich hat sich dort metabolisiertes Gastrin angesammelt. Bekannt ist es auch von anderen Hormonen, daß sie in der Niere abgebaut werden. Dies trifft für Glucagon, Insulin, Vasopressin, TSH und ACTH zu (ASCH und WARTER, 1967). Demgegenüber fanden TRUEBLOOD, KOHATSU, OBERHELMAN und ALTO (1969) sowie REEDER und THOMPSON (1971) keinen Anhaltspunkt für einen möglichen Gastrinabbau in der Niere. Im Urin wurden bisher nur sehr geringe Mengen von Gastrin gefunden. (CLENDINNEN, DAVIDSON, JACKSON und THOMPSON, 1970 und NEWTON und JAFFE, 1971). Nur beim Zollinger-Ellison-

Syndrom scheinen stimulierende Substanzen, die eine gewisse Ähnlichkeit zum Gastrin-Molekül aufweisen, in den Urin zu gelangen. (BONFILS, VATIER und ACCARY, 1970). Vermutlich wird in diesen Fällen eine so hohe Gastrin-Konzentration in der Niere erreicht, daß der Schwellenwert für Gastrin überschritten wird und es daher zur Ausscheidung kommt.

Die carboxylterminale Aminosäuresequenz Try-Met-Asp-Phe-NH₂ besitzt schon die physiologische Wirkung des gesamten Gastrin-Moleküls. Aus Untersuchungen von GREGORY, HARDY, JONES, KENNER und SHEPPARD (1964) ist bekannt, daß der N-terminale Pyroglutamylrest Gastrin vor dem Abbau durch Carboxypeptidasen schützt. Bei der Inaktivierung von Gastrin müßte auf Grund einer Amidase-Wirkung die biologisch notwendige C-terminale Endgruppe hydrolysiert werden. Auch die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse mit CBO-Gly-Phe-NH₂, das wie Gastrin und Pentagastrin einen C-terminalen Phe-NH₂-Rest besitzt, scheinen diese Vermutung zu bestätigen. Jedoch wurden nach 60 Min. Inkubationszeit nur 13 % Substrat hydrolytisch gespalten. Eine völlige Umsetzung konnte nicht erreicht werden. Dieses Ergebnis befriedigt nicht sehr, und es bedarf weiterer Untersuchungen, um eine größere Ausbeute zu erreichen. Sicher müssen dabei noch neben der Inkubationszeit als weitere Faktoren für die Amidhydrolyse die pH-Abhängigkeit, die Abhängigkeit von der Enzymkonzentration und der Einfluß der Dialysedauer berücksichtigt werden.

Neben der experimentell nachgewiesenen Inaktivierung von Gastrin sprechen die Untersuchungen von LASTER und WALSH (1968) ebenfalls für einen enzymatischen Abbau des Moleküls in der Leber und in der Niere. Sie beobachteten dünn-schicht-chromatographisch eine hydrolytische Abspaltung der C-terminalen Amidgruppe von Pentagastrin nach Inkubation mit Homogenaten verschiedener Rattengewebe. Hitzeinaktiviertes Homogenat verlor diese Aktivität. Jedoch unterließen sie, das Material auf seine biologische Wirksamkeit im Tierversuch zu überprüfen.

Möglicherweise spielt noch ein weiterer enzymatischer Abbauweg eine Rolle. Befunde von GLASS, SCHWARTZ und WALTER (1969) scheinen dies bei Peptidhormonen mit C-terminaler Amidgruppe zu bestätigen. So konnten sie mit einem von ihnen gefundenen Enzym, welches sie aus der Blase der Kröte (*Bufo marinus* L) isolierten, eine Inaktivierung von Oxytocin, 8-Lysin-Vasopressin, 8-Arginin-Vasopressin und anderen Hormonen mit carboxyterminaler Amidgruppe feststellen. Ein funktionell ähnliches Enzym wird auf Grund bisheriger Experimente in der Säugetierniere vermutet. Dieses Enzym könnte auch beim Abbau von Gastrin, das ebenfalls eine C-terminale Amidgruppe besitzt, beteiligt sein.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Niere Gastrin inaktivieren kann. Sie bestätigen die von NEWTON und JAFFE (1971) gefundene Gastrin-Inkorporation in der Nierenrinde.

Die aus der Literatur zitierten Befunde zeigen, daß die Leber auch am Gastrinabbau beteiligt ist. Demnach handelt es sich vermutlich beim Abbau von Gastrin um ein multilokuläres Geschehen. Daher braucht es nicht unbedingt durch den Ausfall eines Organes zu einer Hypergastrinämie zu kommen, da möglicherweise die anderen abbauenden Organe kompensatorisch eintreten können. Diese Annahme findet ihre Bestätigung in den Befunden von TRUEBLOOD, KOHATSU, OBERHELMAN und ALTO (1969), die nach bilateraler Nephrektomie keine erhöhte Säuresekretion nach Injektion verschieden großer Gastrindosen gegenüber nicht nephrektomierten Kontrolltieren gefunden hatten. Das wäre auch eine Erklärung für die von REEDER und THOMPSON (1971) angestellten Beobachtungen an Patienten mit Nierenversagen. Analog dazu muß beim Ausfall der Leberfunktion die Niere kompensatorisch wirksam werden. Damit scheint sich zu bestätigen, daß hier eine wichtige Körperfunktion mehrfach abgesichert ist.

VI. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde die säurestimulierende Wirkung von Gastrin II und Pentagastrin nach Inkubation mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat am Rattenmagen untersucht.

Dabei wurde ein Aktivitätsverlust der säurestimulierenden Substanzen festgestellt. Durch Hitzeinaktivierung des Homogenatüberstandes konnte dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden.

Sowohl die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Inkubationszeit, als auch das Wiederauftreten der Aktivität nach Hitzeinaktivierung des Homogenates lassen vermuten, daß ein enzymatischer Vorgang dafür mitverantwortlich sein könnte. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die enzymatische Hydrolyse der C-terminalen Endgruppe im Gastrin- bzw. Pentagastrin-Molekül.

Zum gleichen Ergebnis kommen die Untersuchungen mit Carbobenzoyglycylphenylalaninamid (CBO-Gly-Phe-NH_2). Jedoch waren bei dieser Versuchsanordnung nach 60 Min. Inkubationszeit erst 13 % Substrat hydrolytisch gespalten. Eine völlige Umsetzung des Substrates konnte nicht erreicht werden.

Die vorliegenden Befunde machen deutlich, daß in der Niere eine Inaktivierung von Gastrin durch enzymatische Hydrolyse stattfindet.

Literaturverzeichnis

ASCH, L. und WARTER, J.:

Rôle du Rein dans le Métabolisme des Hormones
Protéiques.
Path. Biol. (Paris) 15, 773 (1967)

BADER, J.P., BONFILS, S., LAUDAT, Ph., DUBRASQUET, M. und
LAMBLING, A.:

Le Pouvoir gastro-sécrétagogue des urines dans le
syndrome de Zollinger-Ellison.
Rev. Int. Hepat. XVI, 723 (1966)

BEGER, H.G., WITTE, C., MEVES, M. und KRAAS, E.:

The effect of the liver on gastric secretion
stimulated with pentagastrin and gastrin II.
2nd Symposium European Gastric Club, Erlangen
Okt. 1970, im Druck

BLAIR, E.L., FARRA, Y., RICHARDSON, D.D. und STEINBOK, P.:

The half-life of exogenous gastrin in the circula-
tion.
J. Physiol. 208, 299 (1970)

BONFILS, S., ROSSI, G. und LAMBLING, A.:

Etude de la sécrétion gastriques du rat par
fistule duodénale.
Rev. franc. Etud. clin. biol. 3, 977 (1958)

BONFILS, S., BADER, J.P., DUBRASQUET, M. und LAMBLING, A.:

Dépistage dans les urines humaines, de substances
excitant la sécrétion gastriques du rat.
C. R. Soc. Biol. 157, 259 (1963)

BONFILS, S., VATIER, J. und ACCARY, J.P.:

Bioassay for gastrin (P.S.U.) and its theoretical
and clinical significance. In: Origin, Chemistry,
Physiology and Pathophysiology of the Gastrointesti-
nal Hormones, edited by CREUTZFELDT, W., F.K.
Schattauer Verlag, Stuttgart, 141 (1970)

CLASSEN, M.:

Magensekretionsanalyse mit Pentagastrin.
Dtsch. med. Wschr. 93, 704 (1968)

CLENDINNEN, B.G., DAVIDSON, W.D., JACKSON, B.M. und THOMPSON,
J.C.:

Renal inactivation of gastrin.
Brit. J. Surg. 57, 864 (1970)

DEMLING, L.:

Neues über Gastrin.
Dtsch. med. Wschr. 90, 177 (1969)

EDKINS, J.S.:

On the chemical mechanism of gastric secretion.
Proc. Roy. Soc. Biol. 76, 376 (1905)

EMAS, S. und FYRÖ, B.:

Vagal release of gastrin in cats following
reserpine.
Acta Physiol. Scand. 63, 358 (1965)

GANGULI, P.C.:

The effect of protein, carbohydrate or fat on
plasma gastrin concentration in human subjects.
Vortr. Brit. Soc. Gastroent. London (1970)

GILLESPIE, I.E. und GROSSMAN, M.I.:

Gastric secretion of acid in response to portal
and systemic venous injection of gastrin.
Gastroenterology 43, 189 (1962)

GLASS, J.D., SCHWARTZ, I.L. und WALTER, R.:

Enzymatic inactivation of peptide hormones
possessing a C-terminal amide group.
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 1426 (1969)

GREENGARD, H., STEIN, I.F. und IVY, A.C.:

Zitat nach LASTER und WALSH
Fed. Proc. 27, 1328 (1968)

GREGORY, R.A., TRACY, H.J., FRENCH, J.M. und SCIRCUS, W.:

Extraction of a gastrin-like substance from a
pancreatic tumor in case of Zollinger-Ellison
syndrome.
Lancet 1, 1045 (1960)

GREGORY, R.A. und TRACY, H.J.:

The constitution and properties of two gastrins
extracted from hog antral mucosa.
Gut 5, 103 (1964)

GREGORY, H., HARDY, P.M., JONES, D.S., KENNER, G.W. und
SHEPPARD, R.C.:

The antral hormone gastrin. Structure of gastrin.
Nature (Lond.) 204, 931 (1964)

GROSSMAN, M.I.:

Gastrin.
Univ. of California Press, Berkely and Los
Angeles (1966)

JAFFE, B.M. und NEWTON, W.T.:

Distribution and localisation of radioiodinated
gastrin.
Surg. Forum 20, 312 (1969)

LAMBLING, A., BONFILS, S., BADER, J.P. und DUBRASQUET, M.:

Le pouvoir sécrétagogue gastrique des urines
de l'homme (P.S.U.). Intérêt clinique, en parti-
culier dans le syndrome de Zollinger-Ellison.
Gastroenterologia 103, 152 (1965)

LASTER, L. und WALSH, J.H.:

Enzymatic degradation of C-terminal tetrapeptide
amide of gastrin by mammalian tissue extracts.
Fed. Proc. 27, 1328 (1968)

LEBEDINSKAJA, S.J.:

Über die Magensekretion bei Eckschen Fistelhunden.
Z. exper. Med. 88, 264 (1933)

LICK, R.F., WELSCH, K.H., HART, W., BRÜCKNER, W., BALSER, D.
und GÜRTNER, Th.:

Zur sekretorischen Funktion des Magens nach Injek-
tion von Histamin, Gastrin und syntetischem Tetra-
peptid in den großen Kreislauf und in die Pfort-
ader.
Z. Gastroent. 5, 7 (1967)

MAUNG PE THEIN und SCHOFIELD, B.:

Release of gastrin from the pyloric antrum following
vagal stimulation by sham feeding in dogs.
J. Physiol. 148, 291 (1959)

McGUIGAN, J.E.:

Gastric mucosal intracellular localization of
gastrin by munofluorescence.
Gastroenterology 55, 315 (1968)

MOORE, F.T., MURAT, J.E., ENDAHL, G.L., BAKER, I.L. und
ZOLLINGER, R.M.:

Diagnosis of ulcerogenic tumor of the pancreas
by bioassay.
Amer. J. Surg. 113, 735 (1967)

NEWTON, W.T. und JAFFE, B.M.:

The fate of intravenously administred radio-labeled gastrin.
Surgery 69, 34 (1971)

NYHUS, L.M., MIGNON, M. und SEMB, L.S.:

Die physiologische und klinische Bedeutung von Gastrin.
Z. Gastroent. 3, 299 (1965)

OLBE, L.:

Potentiation of acid sham feeding response in Pavlov pouch dogs by histamine and by mesenterical vein anastomosis.
Acta Physiol. Scand. 66, 473 (1966)

REEDER, D.D. und THOMPSON, J.C.:

Effect of hemodialysis on serum gastrin levels in uremic patients.
Gastroenterology 60, 795 (1971)

SCHMIDT, F.H. und SCHWARZ, M.:

Über die enzymatische Ammoniakbestimmung im Blut.
Klin. Wschr. 44, 591 (1966)

SEELIG, H.P., LINTHE, H., LÜDCKE, J.B.P., PLEWE, D.,
MÜLLER, U., WÜSTLING, H.U. und KESSLER, M.:

Inaktivierung von Pentagastrin (ICI 50, 123) durch Humanserum und Leberhomogenat.
Klin. Wschr. 48, 1069 (1970)

SEELIG, H.P., MÜLLER, U. und LINTHE, U.:

Inactivation of Gastrin II by rat tissue homogenates human serum and liver amidases.
2nd Symposium European Gastric Club, Erlangen Okt. 1970, im Druck

SEELIG, H.P.:

Gastrin Inaktivierung und Abbau.
Habilitationsschrift (Berlin, 1971)

STELZNER, F.:

Leberveränderungen und Gastroduodenales Ulcus.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 75, 264 (1969)

THOMPSON, J.G., REEDER, D.D., DAVIDSON, W.D., CHARTERS, A.C.,
BRÜCKNER, W.L., LEMMI, C.A.E. und MILLER, J.H.:

Effect of hepatic transit of gastrin, pentagastrin and histamine measured by gastric secretion and by assay of hepatic vein blood.
Ann. Surg. 170, 493 (1969)

TRUEBLOOD, H.W., KOHATSU, S. und OBERHELMAN, H.A.:

Gastric secretory response to synthetic human gastrin. Study of the effect of nephrectomy.
Arch. Surg. 98, 223 (1969)

UVNÄS, B.:

The part played by the pyloric region in the cephalic phase of gastric secretion.
Acta Physiol. Scand. 4, Suppl. 13, 1 (1942)

WILKEN, B.J., HARDY, J.D., TURNER, M.D., LOWE, C.F., HUNT, D.G. und BILLUPS, W.A.:

Bioassay in the diagnosis of the Zollinger-Ellison-Syndrome.
Ann. Surg. 170, 922 (1969)

WILSON, S.D., MATHISON, J.A., SCHULTE, W.J. und ELLISON, E.H.:

The rôle of bioassay in the diagnosis of ulcerogenic tumors.
Arch. Surg. 97, 437 (1968)

Herrn Professor Dr. med. V. Becker, vormaligem Direktor des Pathologischen Instituts der Freien Universität Berlin, Klinikum Westend, danke ich dafür, daß er mir entgegenkommender Weise die Untersuchungen an seinem Institut ermöglichte.

Ganz besonderen Dank sage ich Herrn Priv.Doiz. Dr.med. H.P. Seelig für die Überlassung des Themas und das ständige Interesse an dieser Arbeit.

Außerdem danke ich den Herren H. Linthe, J. Lüdcke und H.-U. Wüstling für die Unterstützung bei den Tieroperationen und der Gastrinextraktion.

Lebenslauf

Am 30. Dezember 1940 wurde ich als Sohn des Lehrers Johannes Plewe und seiner Ehefrau Ursula geb. Herhudt in Elbing/Westpreußen geboren. Der Kriegsausgang verschlug unsere Familie nach Berlin. Hier verbrachte ich auch meine Schulzeit. Ich verließ die Schule vorzeitig und absolvierte eine Lehre als Industriekaufmann. Vom 1. März 1965 bis 31. März 1966 arbeitete ich als kaufmännischer Angestellter in der Hauptverwaltung der Firma OSRAM GmbH Berlin/München. Am 7. Mai 1965 bestand ich als Externer die Reifeprüfung in Berlin.

Im Mai 1966 wurde ich an der Freien Universität Berlin zum Studium der Medizin immatrikuliert. Hier bestand ich im April 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im März 1969 die ärztliche Vorprüfung. Auch den klinischen Teil meines Studiums absolvierte ich in Berlin und beendete mein Studium im August 1972 mit Ablegung der ärztlichen Prüfung. Ab 1. November 1972 werde ich als Medizinalassistent tätig sein.

Dieter Plewe

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

